玉米赤霉烯酮降解酶在枯草芽孢杆菌中的表达及其对母猪繁殖性能的影响

王相生[1]　孙亚宁[1,2]　阮崇美[1]　张全伟[3]　张　勇[1*]　胡骁飞[2]

（1.甘肃农业大学动物医学院，兰州 730070；2.河南省农业科学院，农业部动物免疫学重点实验室，郑州 450002；3.甘肃农业大学生命科学技术学院，兰州 730070）

摘　要：本试验旨在建立玉米赤霉烯酮（ZEN）降解酶基因 *ZEN-jjm* 在枯草芽孢杆菌中的表达体系，确定其产物的生物降解活性及对母猪繁殖性能的作用。克隆 *ZEN-jjm* 基因，经 EcoR Ⅰ和 Not Ⅰ双酶切后连接至 *pHT*01 表达载体中，构建重组质粒；转化枯草芽孢杆菌，通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析 ZEN-jjm 蛋白表达水平。高效液相色谱法（HPLC）检测表达的 ZEN-jjm 蛋白降解 ZEN 的活性。通过对母猪的繁殖性能的评价，确定 ZEN 降解酶降解 ZEN 对母猪繁殖性能的影响。双酶切和测序结果表明：*ZEN-jjm* 成功插入 *pHT*01 中，SDS-PAGE 表明获得 1 株高效表达目的蛋白的重组枯草芽孢杆菌，其大小约为 29 ku。HPLC 结果表明表达的 ZEN-jjm 蛋白能有效地降解 ZEN；表达的 ZEN-jjm 蛋白能显著缓解 ZEN 对繁殖母猪的毒害作用（$P<0.05$）。综上：1）本研究成功构建了表达 *ZEN-jjm* 在枯草芽孢杆菌中的表达载体，并在枯草芽孢杆菌中得到了表达。2）表达的 ZEN-jjm 蛋白具有降解 ZEN 的生物活性。3）在饲粮中添加 ZEN-jjm 蛋白能显著降低 ZEN 对母猪能繁殖性能的危害。

关键词：玉米赤霉烯酮；*ZEN-jjm* 基因；枯草芽孢杆菌；母猪

中图分类号：S816　　文献表示码：　　文章编号：

玉米赤霉烯酮（zearalenone，ZEN）作为世界上污染粮食最广泛的真菌毒素之一，对其危害性的研究很多，且由于ZEN具有雌激素作用，主要作用于生殖系统，因此对妊娠期的动物危害最大[1-3]。有研究表明母猪长期采食3～5 mg/kg ZEN污染的全价配合饲粮，在妊娠期会引起流产、死胎和畸胎；后备母猪出现假发情，外阴肿胀、红肿，子宫受损出血以及不发情的症状，从而给规模化猪场造成不可估量的损失[4]。因此研究有效清除ZEN的方法已经成为畜牧行业关注的焦点，并且对食品和饲料安全也具有重要的意义。目前针对饲料及其原料中ZEN的脱毒方法主要有物理脱毒法、化学脱毒法和生物脱毒法。但是传统的物理和化学方法都存在着劳动量大、试剂应用的可行性差，而且对营养物质，尤其是小分子营养物质，如维生素、药物具有破坏作用，并且由于清除不彻底，很容易造成二次污染。

有研究表明，有益的芽孢杆菌类微生物在吸附和降解霉菌毒素和ZEN、黄曲霉毒素都发

收稿日期：2017–04–11

基金项目：“十二五”国家科技支撑计划“畜禽产品安全监控和检测技术研究与示范”（2014BAD13B05）

作者简介：王相生(1972－)，男，河南濮阳人，博士研究生，从事临床兽医学产科方向的研究。E-mail: wxs201302@163.com

*通信作者：张　勇，教授，博士生导师，E-mail: zhangyong@gsau.edu.cn

挥了重要作用，尤其对ZEN的降解效果更加明显[5-6]。由于酶制剂的专一性、高效性，因此其可将ZEN彻底分解而不会有ZEN素毒性物质残留。据报道，在毕赤酵母等真菌中分离得到的内酯水解酶，主要的作用就是分解ZEN毒素(基因标示为*zhd*101)，分离得到的内酯水解酶经过活性检测可将ZEN标准品彻底分解[7]。*zhd*101是粉红螺旋聚孢霉中的一个编码泛解酸内酯水解酶的基因，近几年关于*zhd*101基因研究为数不多，Bakutis等[8]和Kakeya等[9]分别在大肠埃希菌和裂殖酵母中通过分子生物学技术表达出*zhd*101，程波财等[10]从粉红螺旋聚孢霉中克隆到类似*zhd*101的ZEN降解酶基因（*ZEN-jjm*），通过基因克隆、载体构建等技术在原核生物中表达得到了ZEN降解酶。总结前人的研究工作，发现在以下几个方面需要进一步完善：一是*ZEN-jjm*在枯草芽孢杆菌中的表达研究相对匮乏，二是ZEN降解酶在动物试验中对母猪繁殖性能的影响评价尚未见报道。因此，本试验重新构建了*ZEN-jjm*在枯草芽孢杆菌中的表达体系，以确定表达的ZEN降解酶是否具有降解ZEN的生物活性和降低对母猪繁殖性能危害的作用。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　质粒和菌株

含基因的质粒由北京奥科鼎盛生物科技有限公司构建并保存，枯草芽孢杆菌表达载体、大肠杆菌 DH5α、枯草芽孢杆菌株均由北京奥科鼎盛生物科技有限公司保存。

1.1.2　试剂

PCR扩增试剂盒、低分子量标准蛋白标记、DNA标记、RNA酶抑制剂、焦碳酸二乙酯、蒸馏水、缓冲液、感受态制备试剂盒、质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒、蛋白胨、DNA胶回收试剂盒、限制性内切酶（EcoRⅠ和NotⅠ）以及Pfu DNA聚合酶购于北京奥科鼎盛生物科技有限公司。

1.1.3　仪器

PCR扩增仪（Eppendorf，德国)、电转化仪（BioRad，美国)、高速离心机（Eppendorf，德国)、高效液相色谱仪（Agilent，德国）和仪器凝胶成像分析仪（BioRad，美国)。

1.1.4　试验动物及材料

试验母猪由广州从化种猪场提供。ZEN标样购于Sigma公司

1.2　试验方法

1.2.1　引物设计及酶切位点设计

根据已知 *ZEN-jjm* 基因全长序列，设计基因全长扩增引物，由 Oligo 6 引物设计软件设计，序列为上游引物：5'-ATGCGCACTCGCAGCACAAT-3'，引入 EcoRⅠ酶切位点；下游引物：5'-TCAAAGATGCTTCTGCGTAGTTTCC-3'，引入 NotⅠ酶切位点。引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

1.2.2　*ZEN-jjm* 基因的 PCR 扩增

用北京天根公司 2×Pfu PCR MasterMix，以从 mRNA 逆转录 cDNA 为模板，目的基因全长序列约 750 bp，反应体系为 25 μL。引物及其试剂均由北京天根生物科技有限公司合成。PCR 反应程序：94 ℃，3 min；94 ℃、30 s，55 ℃、30 s，72 ℃、1 min，30 个循环；72 ℃延伸 5 min。

1.2.3　PCR 体系配制及结果检测：

反应体系：1 μL cDNA，1 μL 上游引物（10 μmol/L），1 μL 下游引物（10 μmol/L），12.5 μL 2×Pfu PCR MasterMix，ddH_2O 补至 25 μL。

结果检测：反应结束后取 5 μL 反应产物，1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。电泳凝胶结束后切胶，用质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。

1.2.4　重组表达载体 *pHT*01-*zhd*101 的构建

纯化后的 PCR 产物和枯草芽孢杆菌表达载体 *pHT*01 用 EcoRⅠ和 NotⅠ进行双酶切，便于外源基因的插入。如果在这些酶切位点以外有外源基因的插入，会导致某种标记基因的失活，而影响筛选试剂盒回收目的片段。经过酶切后取适量的目的基因片段。选择的基因片段和载体片段用 T4 连接酶于 22 ℃连接 3 h。连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，无菌操作和保持低温，且培养物处于对数生长期。在含 100 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上筛选重组子，挑取阳性克隆，提取重组质粒，用 PCR 法和 EcoRⅠ/NotⅠ双酶切法进行鉴定。

1.2.5　基因测序及比对分析

将 PCR 和酶切鉴定正确的克隆样本送往北京奥科鼎盛生物科技有限公司进行 DNA 测序，经测序结果比对，插入的片段序列完全正确，可用于下一步蛋白诱导表达。

1.2.6　枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备

选用生长培养基制备枯草芽孢杆菌感受态细胞，方法参考文献[10]。

1.2.7　枯草芽孢杆菌的转化

将重组质粒 *pHT*01-*ZEN-jjm* 转化至枯草芽孢杆菌感受态细胞，挑取 2 个克隆样进行诱导表达目的蛋白。

1.2.8　重组枯草芽孢杆菌的诱导表达

将转化质粒的枯草芽孢杆菌接至发酵培养基中，于 37 ℃、200 r/min 下震荡培养至对数生长期，加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷诱导 6 h，离心收集菌体上清，加入上样缓冲液进行煮沸变性。吸取 10 μL 上样进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析。

1.2.9　检测 ZEN 降解酶活性

取重组枯草芽孢杆菌诱导表达的上清液，在实验室内进行 ZEN 降解酶效价的降解实验，在重组枯草芽孢杆菌诱导表达的上清液中加入 ZEN 溶液(ZEN 系标准品由北京奥科鼎盛生物科技有限公司提供，终浓度为 1 g/mL)，以未表达的培养上清液为阴性对照，分别于 30%比例进行降解，降解时间为 9 h，然后进行高效液相色谱检测 ZEN 残留。

1.2.10　ZEN 降解酶降解 ZEN 对母猪繁殖性能的影响评价

试验采用单因素试验设计，选择体重约为 200 kg 的 60 头已经妊娠 90 d 的长×大二元杂交母猪，根据胎次相近、体重接近健康的妊娠母猪分为 3 组，每组 20 头，1 个限位栏饲养 1 头母猪。试验分组见表 1。试验饲粮参考 NRC（2012）标准中妊娠母猪营养需要配制。采用粉状玉米–豆粕–鱼粉型普通全价配合饲粮，基础饲粮营养水平为消化能 13.00 MJ/kg、粗蛋白质 15.63%、赖氨酸 0.67%、钙 0.87%、总磷 0.67%、有效磷 0.42%和食盐 0.40%。经高效液相色谱检测其 ZEN 的含量为 267 μg/kg，符合国家饲料卫生标准。试验组分别饲喂在基础饲粮中添加 1.5 mg/kg ZEN 和 1.5 mg/kg ZEN+100 mg/kg ZEN 降解酶的饲粮。试验猪场按照常规饲养管理进行，每日 07:00 和 17:00 饲喂饲粮，自由饮水，防疫等保健措施按照正常运行。每天饲喂量为 2.5 kg/d，各组饲喂量一致，试验期间母猪自由饮水，在怀孕母猪分娩的当天采食量为零，其他饲养管理与保健措施遵循试验猪场的日常管理制度；每天记录母猪健康状况。

表 1　试验分组

Table 1　Groups of the experiment

组别 Groups	处理 Treatment
对照组 Control group	基础饲粮（267 μg/kg ZEN）
试验 1 组 Experimental group 1	基础饲粮+1.5 mg/kg ZEN
试验 2 组 Experimental group 2	基础饲粮+1.5 mg/kg ZEN+100 mg/kg ZEN 降解酶

试验期怀孕母猪测定的相关繁殖生产性能当妊娠母猪在分娩的 12 h 之内完成，试验组和对照组的试验人员记录每头母猪的每窝总产仔数、每窝活产仔数、每窝死胎数、每窝木乃伊胎数，并且在统计窝重数据后再称重每头仔猪的个体初生重等。

1.3　数据统计分析

数据采用 SPSS 软件进行单因素方差分析（one-way ANOVA），用 Duncan 氏法进行多重比较，数据均采用“平均值±标准误”表示，$P<0.05$ 表示差异显著，$P<0.01$ 表示差异极显著。

2　结果与分析

2.1　*ZEN-jjm* 基因的 PCR 扩增

ZEN-jjm 基因片段进行 PCR 扩增和分离，其电泳图谱如图 1，*ZEN-jjm* 基因片段的 PCR 产物大小是一条长约 800 bp 的条带，与 NCBI 中的目的基因片段大小相符。

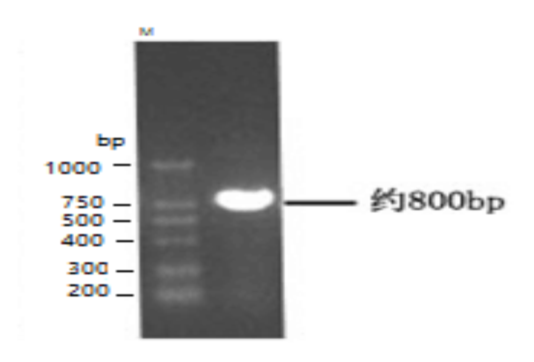


图 1　*ZEN-jjm* 基因的 PCR 电泳图

Fig.1　PCR electrophoretogram of *ZEN-jjm* gene

2.2　*pHT*01-*ZEN-jjm* 重组表达载体构建和鉴定

电泳图谱如图 2，挑选的 3 个克隆样经 EcoR Ⅰ 和 Not Ⅰ 双酶切后有 2 个克隆切出了与目的基因（约 800 bp）大小相一致的条带，经测序比对分析表明，成功构建了 *pHT*01-*ZEN-jjm* 表达载体。

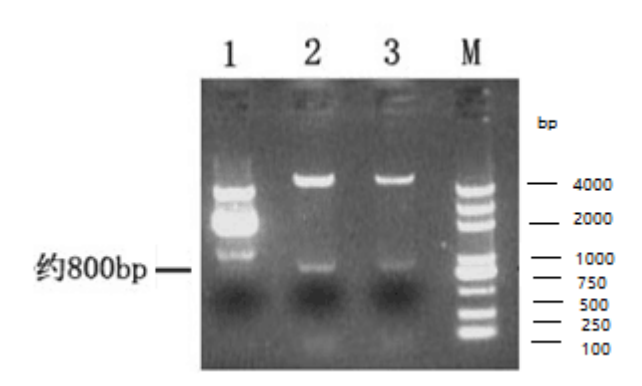


图 2　*pHT*01-*ZEN-jjm* 重组表达载体的 EcoR Ⅰ 和 Not Ⅰ 双酶切分析电泳图

Fig.2　Electrophoretogram of *pHT*01-*ZEN-jjm* recombinant plasmid digested with EcoR Ⅰ　and Not Ⅰ dienzymatic analysis

2.3　ZEN-jjm蛋白的诱导表达筛选

筛选结果如图3，2株重组枯草芽孢杆菌表达的蛋白与预期蛋白分子质量大小相当(约为29 ku)。

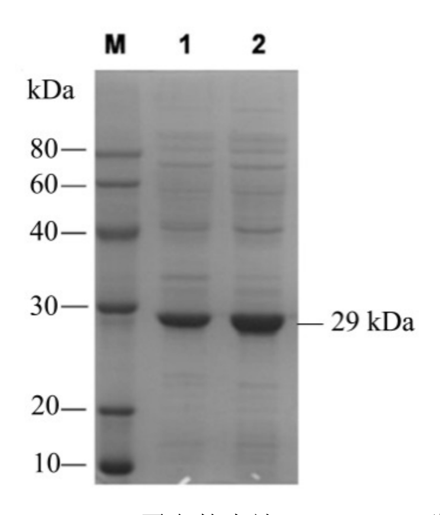


图 3　ZEN-jjm 蛋白的表达 SDS-PAGE 分析

Fig.3　Analysis of SDS-PAGE for ZEN-jjm protein expressed

2.4　ZEN 降解酶降解 ZEN 活性检测

样品经高效液相色谱法检测结果如表 2，经过 ZEN 污染的玉米在表达后的枯草芽孢杆菌培养上清共同在培养箱中孵育 30 min 后，ZEN 降解效果如表 2，降解率接近 70%，经过 90 min 的酶解，被污染的玉米种几乎检测不到 ZEN 的残留，降解率达到了 92%以上。说明表达的 ZEN 降解酶能有效地降解 ZEN，具有生产使用成本低，使用安全的特点。

表 2　高效液相色谱检测经 ZEN 降解酶降解后样品中的 ZEN 残留

Table 2　Residual of ZEN in the samples after being degraded by ZEN degrading enzyme analyzed by high performance liquid chromatography

项目 Items	ZEN 含量 ZEN content/(mg/L)	降解率 Degradation rate/%
对照组 Control group	5.89	
试验组 30 min 后 Experimental group after 30 min	1.78	69.8
试验组 90 min 后 Experimental group after 90 min	0.45	92.4

2.5　ZEN 降解酶降解 ZEN 对母猪繁殖性能的影响评价

由表 3 可知，饲喂添加 1.5 mg/kg ZEN 的饲粮后，妊娠期母猪分娩的死胎数和弱仔数显著高于对照组（P＜0.05），且总产仔数和仔猪初生重与对照组相比也出现降低（P＞0.05）；与试验 1 组相比，饲喂添加 1.5 mg/kg ZEN+100 mg/kg ZEN 降解酶的饲粮可显著降低 ZEN 造成的死胎数和弱仔猪数（P＜0.05）。

表 3　ZEN 以及 ZEN 降解酶对母猪妊娠期繁殖性能的影响

Table 3　Effects of dietary ZEN and ZEN degrading enzyme on reproductive performance of pregnant sows

项目 Items	对照组 Control group	试验 1 组 Experimental group 1	试验 2 组 Experimental group 2
总产仔数 Litter size	12.45±1.191[a]	11.25±1.372[a]	12.35±1.389[a]
死胎数 Stillbirth number	0.65±0.745[b]	1.15±0.988[a]	0.68±1.324[b]
弱仔数 Scrawny piglet number	0.85±0.813[b]	1.25±0.910[a]	0.95±0.315[c]
仔猪初生重 Birth weight of piglets/kg	1.41±0.044	1.34±0.054	1.40±0.069

3　讨　论

ZEN 不仅作为食品安全中的重大隐患[11]，而且对畜牧业尤其是兽医产科疾病影响巨大，矿物质（如蒙脱石、硅铝酸盐、酵母细胞壁提取物等）在吸附和微生物（芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌等）在降解 ZEN 等发挥了重要作用[3]。Bakutis 等[8]发现酿酒酵母等（酵母细胞壁提取物）的主要成分是低聚葡聚糖类产品，能较好地吸附清除 ZEN。Kakeya 等[9]发现粉红螺旋聚孢霉(*Clonostachys rosea*)有 2 种类型的产孢结构，即帚状分生孢子梗和轮枝状分生孢子梗，主要依靠其所分泌的胞外降解酶类，经过分离纯化能降低 ZEN 在生殖系统的毒性。ZEN 对线粒体代谢、等离子体膜透性和前列腺癌细胞细胞周期有影响。在 100 和 0.3 nm 的浓度中，ZEN 导致线粒体的氧化活性下降，乳酸脱氢酶释放，凋亡诱导和 G0/G1 阶段的细胞数目增加[12]。ZEN 是一类 2,4-二羟基苯甲酸的内酯化合物，破坏其酯环可去除 ZEN 的毒性，把 ZEN 降解为没有类雌激素毒性的表达产物[9]。

Takahashi-Ando 等[13]的研究结果表明，经过基因克隆、载体构建大肠杆菌表达的 ZEN 内酯水解酶 zhd101，在 37～45 ℃的水浴锅内，把含有 ZEN 标准品的溶液 pH 调整为 10.5 时，具有很强的降解 ZEN 毒性的活性，而且该反应是一种不可逆灭活。内酯水解酶 zhd101 对 5 种同源 ZEN 有效，但是对 5 种同源的 ZEN 降解效果不完全一致[14]。Molnar 等[14]经过

了大量的实验室研究，发布了一种新的酵母菌株——毛孢子菌属，可以使 ZEN 降解为二氧化碳和其他无毒 ZEN 代谢产物，这能否应用在畜禽、水产等动物的全价配合饲料中做为 ZEN 的脱毒剂使用，还需生产一线的确切验证。Mokoena 等[15]报道了经过 96 h 的液体生物发酵，乳酸菌在发酵过程中也可以显著地降解谷物如玉米、豆粕、大麦、麸皮等原料中 68%～75% 的 ZEN。在本试验中我们用 *pHT*01 表达载体降解 ZEN 的蛋白酶，因为枯草芽孢杆菌自身蛋白干扰少，而且枯草芽孢杆菌生长环境多样，可利用的营养物质种类十分丰富，其自身含有丰富的产酶系统，具备目的蛋白表达量高的应用潜力，并保持生物活性等优点[16]，使 ZEN 降解酶的使用更加安全，是更有效和更低成本地降解 ZEN 毒素的方法。

有研究表明ZEN中毒对猪类的健康影响较大，引起生殖器官功能性的变化。Minervini等[17]从断奶后32日龄开始给小仔猪饲喂含9 mg/kg ZEN的饲粮，30 d后经过检测，仔猪的繁殖系统出现了异常，具体表现为卵母细胞不能正常成熟，而且有的仔猪的染色体出现异常现象。Jadamus等[18]连续3个繁殖周期给妊娠的经产母猪饲喂含180g/kg ZEN的全价配合饲粮，断奶后的母猪表现为返情率升高，怀孕期的母猪流产率明显升高；在第1个繁殖周期，表现出提早发情的异常现象。Jan Obremski等[19]给怀孕期的母猪饲喂0.2和0.4 mg/kg BW ZEN，饲喂为期1周，结果发现添加ZEN组的母猪出现卵泡闭锁，甚至有的母猪出现卵巢颗粒细胞凋亡，严重的出现了子宫和输卵管细胞增殖。本试验结果也表明，饲粮中含有微量的ZEN（1.5 mg/kg）就可以能显著降低母猪健康活胎的数量和并显著提高弱仔猪发生率。这与饲粮中低剂量ZEN及其代谢产物扰乱内分泌系统，影响动物的发情周期、排卵与胚胎附植有关[19-20]。但是，添加ZEN降解酶后，试验2组的总产仔数、死胎数、弱仔数、仔猪初生重等并没有出现明显的负面效应，表明ZEN降解酶能够有效地降解ZEN对母猪生产性能和繁殖性能的多种毒害作用。

4　结　论

ZEN 可以引起母猪妊娠期繁殖性能的降低，低剂量 ZEN（1.5 mg/kg）污染就可以能显著降低母猪活胎的数量和并显著提高弱仔猪发生率，对母猪的繁殖性能产生毒害作用。

本试验中用基因表达合成 *zhd*101 基因的转基因枯草芽孢杆菌能把高浓度的 ZEN(1.5 mg/kg)去除。从母猪的总产仔数、死胎数、弱仔数、仔猪出生重的指标评价，表明构建的 ZEN 降解酶能够有效地降解 ZEN 对母猪妊娠期生产性能和繁殖性能的毒害作用。

参考文献：

[1] BENNETT J W,KLICH M.Mycotoxins[J].Clinical Microbiology Reviews,2003,16(3):497–516.

[2] TAKAHASH-ANDO N,KIMURA M,KAKEYA H,et al.A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone:enzyme purification and gene cloning[J].Biochemical Journal,2002,365(1):1–16.

[3] ZINEDINE A,SORIANO J M,MOLTÓ J C,et al.Review on the toxicity,occurrence,metabolism,detoxification,regulations and intake of zearalenone:an

oestrogenic mycotoxin[J].Food and Chemical Toxicology,2007,45(1):1–18.
[4] GLAVITIS R,VANYI A. More important mycotoxicoses in pigs.Comprehensive clinico-pathological communication[J].Magyar Allatorvosok Lapja,1995,50(7):407–420.
[5] 熊凯华,程波财,胡威,等.玉米赤霉烯酮降解的研究进展[J].中国粮油学报,2010,25(1):138–142.
[6] 计成,赵丽红.黄曲霉毒素生物降解的研究及前景展望[J].动物营养学报,2010,22(2):241–245.
[7] 薛章荣.减少镰刀霉菌毒素污染的分子生物学和生物技术[J].世界农药,2007,29(4):7–10.
[8] BAKUTIS B,BALIUKONIENE V,PAĐKEVIÈCIUS A.Use of biological method for detoxification of mycotoxins[J].Botanica Lithuanica,2005,7:123–129.
[9] KAKEYA H,TAKAHASHI-ANDO N,KIMURA M,et al.Biotransformation of the mycotoxin,zearalenone,to a non-esrtogenic compound by a fungal strain of *Clonostachy* s sp[J].Bioscience,Biotechnology,and Biochemistry,2002,66(12):2723–2726.
[10] 程波财,史文婷,罗洁,等.玉米赤霉烯酮降解酶基因(*ZEN-jjm*)的克隆、表达及活性分析[J].农业生物技术学报,2010,18(2):225–230.
[11] OLDENBURG E,HÖPPNER F,ELLNER F,et al.Fusarium diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed[J].Mycotoxin Research,2017,33(3):167–182.
[12] KOWALSKA K,HABROWSKA-GÓRCZYŃSKA D E,Domińska K,et al.The dose-dependent effect of zearalenone on mitochondrial metabolism,plasma membrane permeabilization and cell cycle in human prostate cancer cell lines[J].Chemosphere,2017,180:455–466.
[13] TAKAHASHI-ANDO N,OHSATO S,SHIBATA T, et al.Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea*[J].Applied and Environmental Microbiology,2004,70(6):3239–3245.
[14] MOLNAR O,SCHATZMAYR G,FUCHS E,et al.*Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov.,a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins[J].Systematic and Applied Microbiology,2004,27(6):661–671.
[15] MOKOENA M P,CHELULE P K,GQALENI N.Reduction of fumonisin B_1 and zearalenone by lactic acid bacteria in fermented maize meal[J].Journal of Food Protection,2005,68(10):2095–2099.
[16] KARLOVSKY P.Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding,feed and food production[J].Natural Toxins,1998,7(1):1–23.
[17] MINERVINI F,DELL'AQUILA M E,MINOIA P,et al.Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on *in vitro* maturation of bovine oocytes and 17 β-estradiol levels in mural granulosa cell cultures[J].Toxicology *in Vitro*,2001,15(4/5):489–495.
[18] JADAMUS A,SCHNEIDER D.Long-term effect of fusariotoxins on the reproductive performance of sows[J].Feed Magazine,2002,10:396–405.

[19] JAN OBREMSKI A,GAJĘCKI M,ZWIERZCHOWSKI W,et al.The level of zearalenone and a-azearalenol in the blood of gilts with clinical symptoms of toxicosis, fed diets with a low zearalenone content[J].Journal of Animal and Feed Sciences,2003,12(3):529–538.
[20] GZYL-MALCHER B,FILEK M,RUDOLPHI-SKÓRSKA E,et al.Studies of lipid monolayers prepared from native and model plant membranes in their interaction with zearalenone and its mixture with selenium ions[J].The Journal of Membrane Biology,2017,250(3):273–284.

Expression of Zearalenone Degrading Enzyme in *Bacillus subilis* and Its Effects on Reproductive Performance of Sows

WANG Xiangsheng[1] SUN Yaning[1,2] RUAN Chongmei[1] ZHANG Quanwei[3] ZHANG Yong[1*] HU Xiaofei[3]
（1. *College of Veterinary Medicine, Gansu Agriculture University*, *Lanzhou* 730070, *China*; 2. *Henan Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Zhengzhou* 450002, *China*; 3. *College of Life Science and Technology, Gansu Agriculture University, Lanzhou* 730070, *China*）

Abstract: The purpose of this study was to establish an expressing system of zearalenone (ZEN) degrading enzyme gene (ZEN-*jjm*) in *Bacillus subtilis*, and to determine the biodegradation activity and effect of its expression product on reproductive performance of sows. The *ZEN-jjm* gene was cloned and the recombinant expression plasmid was constructed by ligation cloned *ZEN-jjm* and *pHT*01 vector digested with EcoR Ⅰ and Not Ⅰ enzymes, and then transformed into *Bacillus subilis*. Expression of ZEN-jjm protein in *Bacillus subilis* was analyzed by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). And the degrading activity of ZEN-jjm protein was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The effects of ZEN degrading enzyme on reproductive performance of sows were evaluated. The results of double enzyme digestion and DNA sequencing demonstrated that *ZEN-jjm* was inserted into *pHT*01. The SDS-PAGE showed that one *Bacillus subilis* strain with high-level expression was obtained, and the size of the expressed protein was about 29 ku. The HPLC result illustrated that the expressed ZEN-jjm protein could effectively degrade ZEN. The evaluation results of reproductive performance of sows indicated that the expressed ZEN-jjm protein could significantly relieve the toxicity for sows caused by ZEN (P<0.05). In conclusion: 1） the *ZEN-jjm* expression vector is successfully constructed and the ZEN-jjm protein is expressed in *Bacillus subtilis* in this study. 2) The expressed ZEN-jjm protein has the biological activity of degrading ZEN. 3) ZEN-jjm protein can significantly reduce the harm of ZEN on reproductive performance of sows when it is added in the feed.

Key words: zearalenone; *ZEN-jjm* gene; *Bacillus subilis*; sows

*Corresponding author, professor, E-mail: zhangyong@gsau.edu.cn (责任编辑 田艳明)